

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 59-192084

(43)Date of publication of application : 31.10.1984

(51)Int.Cl.

G12N 1/14  
// G12Q 1/24

(21)Application number : 58-065227

(71)Applicant : TERUMO CORP

(22)Date of filing : 15.04.1983

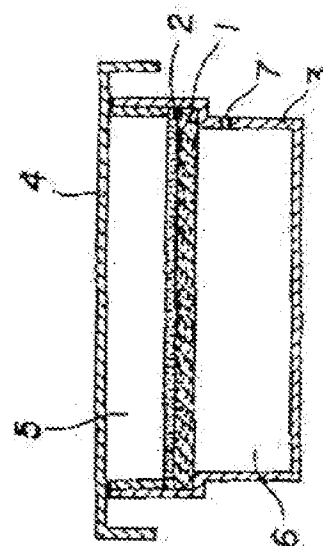
(72)Inventor : KAMINAGAYOSHI SATOSHI

## (54) SEPARATED CULTIVATION OF MICROORGANISM IN BLOOD

## (57)Abstract:

PURPOSE: To enable growth of colony in a short time by direct separated cultivation of microorganism in the blood without requiring operations such as enrichment culture, etc., by using a material obtained by attaching a filter not to pass microorganisms through to a dried absorbing substance having absorbed a liquid medium.

CONSTITUTION: A liquid medium is absorbed in an absorbing substance, and dried. The filter 2 not to pass microorganisms through is attached to the absorbing substance 1, the container 3 is provided with the filter with the absorbing substance to prepare a filter culture medium, a mixture of blood containing microorganisms, a hemolysis agent, and an anticoagulant is poured into the filter, filtered, the filtered microorganisms on the filter are cultivated by nutrition supplied from the absorbing substance. The medium is not preabsorbed in the absorbing substance, and the liquid medium together with the blood containing the microorganisms may be added to the filter. The absorbing substance preferably has absorption ability to absorb almost the whole amount of a specimen to be filtered, and a cellulosic filter, nonwoven fabric, etc. are preferable as a material for it.



⑨ 日本国特許庁 (JP)  
 ⑩ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開  
 昭59—192084

⑫ Int. Cl.  
 C 12 N 1/14  
 C 12 Q 1/24

識別記号

庁内整理番号  
 6712—4B  
 8213—4B

⑬ 公開 昭和59年(1984)10月31日

発明の数 2  
 審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑭ 血中細菌の分離培養法

⑮ 特 願 昭58—65227

⑯ 出 願 昭58(1983)4月15日

⑰ 発 明 者 上永吉敏

東京都渋谷区本町5丁目25番2

⑱ 出 願 人 テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番  
 1号

⑲ 代 理 人 弁理士 西村公佑

明 細 書

1. 発明の名称

血中細菌の分離培養法

2. 特許請求の範囲

(1) 細菌混入血液を溶血剤および抗血液凝固剤からなる溶液と混合し、該混合物を、液体培養を容易乾燥させた液体と該液体の上面に播種された細菌を透過しない大きさの孔を有するフィルタとを容器に収容してなる培養装置でろ過し、ろ過されたフィルタ上の細菌をそのまま培養することを特徴とする血中細菌の分離培養法。

(2) 細菌混入血液を溶血剤、抗血液凝固剤および液体培養からなる溶液と混合し、該混合物を、液体と該液体の上面に播種された細菌を透過しない大きさの孔を有するフィルタとを容器に収容してなる培養装置でろ過し、ろ過されたフィルタ上の細菌をそのまま培養することを特徴とする血中細菌の分離培養法。

3. 発明の詳細な説明

1. 発明の背景

技術分野

本発明は、血液中の細菌を分離し、培養する装置を方法に關するものである。

敗血症や菌血症等重篤な全身感染症においては患者血液中に細菌が存在しているので、これら感染症の診断には血液の細菌検査が行なわれる。また抗菌剤の動物試験による無効判定においても血液の細菌検査が行なわれる。これらの細菌検査には先ず検体血液から細菌を培養および分離することが必要であり、次いで菌数の測定や菌の同定等が行なわれる。本発明の方法はこのような細菌検査に利用される。

(先行技術および問題点)

従来、血中細菌の培養および分離は、採取した血液を液体培養培地と混合して培養が促進した菌で濁るまで培養し、次に増殖した菌を採取分離して血球集天平板、チ。コレート集天平板等の培地上に移植してさらに培養することによ

って菌液などのコロニー育成が行なわれている。

このように従来法においては菌液から少ない細胞を直接分離して培養することが困難であり、コロニーを育成する前処理として増菌培養という付加的な操作で菌数を増やすことを必要とするため複雑な操作と時間を要している。特に上記のような液体中での増菌培養は一般に1日ないし10日の長時間を要するし更にコロニー育成に1日〜2日を要していた。また血液はそれ自体菌の増殖を抑制する作用を有し、抗菌剤が投与されている場合には血液中の菌の増殖は一層阻害であり、液体中の細胞数が少ない場合には検出不可能な場合もある。さらに菌を分離培養に移植する際、菌液培養や培養地への細胞混入のみそれもある。

### 1. 発明の目的

従って本発明の目的は、血中細胞の増殖培養等の付加的な操作を必要とせず、直接血液中の細胞を集め、他の培養地で分離移植することなくそのまま細胞を分離培養して短時間でコロニーを

育成することが可能な方法を提供することにある。

### II. 発明の具体的な説明

本発明は第1に、細胞混入血液を溶血剤および抗血液凝固剤からなる溶液と混合し、該混合物を、液体培養地を含む容器させた液体と該液体の上面に接着された細胞を通さない大きさの孔を有するフィルタとを容器に収容してなる過培養器でろ過し、ろ過されたフィルタ上の細胞をそのまま培養することを特徴とする血中細胞の分離培養法からなる。

本発明は第2に、細胞混入血液を溶血剤、抗血液凝固剤および液体培養地からなる溶液と混合し、該混合物を、液体と該液体の上面に接着された細胞を通さない大きさの孔を有するフィルタとを容器に収容してなる過培養器でろ過し、ろ過されたフィルタ上の細胞をそのまま培養することを特徴とする血中細胞の分離培養法からなる。

本発明の方法を実施するに際しては、先づ、

採取した細胞混入血液を溶血剤および抗血液凝固剤からなる溶液と混合する。この操作は、次のろ過操作のための前処理であり、赤血球の溶血と凝固の防止を目的として行なわれる。使用される溶血剤および抗血液凝固剤には特に制限はなく、それ自体公知のものが用いられる。例えば溶血剤としてはサポニンが好適に使用され、抗凝固剤としては、アミロ酸ナトリウム、ポリアネトール酸ナトリウム等が使用される。

かくして前処理された血液は、ろ過培養器でろ過され、ろ過された細胞は他の培養地に移植することなくそのままフィルタ上で培養される。

本発明で使用されるろ過培養器は、図1図に示す如く、液体培養地を含む容器2と液体1と、該液体1の上面に接着された細胞を通さない大きさの孔を有するフィルタ2とを収容する容器3および該容器3の開口部を被り蓋4とからなる。容器3には、フィルタ2の上方にろ過前の血液を貯留する空間5が、液体1の下方にはろ過後の血液を貯留する空間6および通気

孔7がそれぞれ設けられている。

液体1は、ろ過する媒体をほぼ全量吸収する吸収能をもつことが望ましく、材質としてはセルローズ系のろ紙、不織布等が適当である。液体培養地には液体培養地が含まれており、液体培養地としては、細胞の増殖培養用としてそれ自体公知のものが使用される。本発明の方法においては、培養地を上記のように液体1に含まれる代りに、これを前述した溶血剤および抗血液凝固剤の溶液に加えておくこともできる。

フィルタ2の孔径は細胞を徹底的に通さないものとし、0.75ミクロン以下、好ましくは0.45ミクロン程度にするのがよい。フィルタの材質は血液に対して不活性であれば特に制限はないが、代表例としてニトロセルロース、ポリカーボネート、ポリアミド、セルロースエチレンなどをあげることができ、市販のものとしてはミリポア(ミリポアコーポレーション製)メトリセル(ゲルメンインストルメントカンパニー製)などがあげられる。これらのフィル

## 実施例

フィルタとしてはポアサイズ0.45 $\mu$ mのエト  
ロセルローズ製ノンブレンフィルタ（東洋  
硝子製）、吸水体としてはセルローズ製ろ紙  
NO-63P（東洋硝子製）を用い、フィルタと吸  
水体の接合は、低融点ナイロンをフィルタと吸  
水体の間に介在させ熱融着を行なった。フィル  
タと吸水体の径は $\phi$ 50mmであり、これを第1図  
のごとく作製する。実際に従来法との比較を行  
なった。すなわち、あらかじめ増殖、抗酸菌、  
溶血菌（計1.0ml）を含んだ容器に血液2.0ml  
を分注し、これを普通培養器に分注し、培養を  
行なう方法と従来の懸液培養（保乳5号（保研  
社製）、ベキ、タイナ-50（BD社製））との比較  
を行なった。結果を表1に示すが、*Meningitis*  
では従来の懸液培養にて検出不可能であったが、  
本発明の方法では1日で検出可能であり、血中  
細菌数も測定できる。さらにコロニーとして分  
離されていることから直ちに同定試験、薬剤感  
受性試験が行なえる。また他の菌種についても

は、血液のろ過が容易なようにそれ自体の細  
のろ過によってろ過処理されているのが望まし  
い。フィルタと吸水体との接合は接合剤により  
行うのがよく、接合剤としてはナイロンなどの  
低融点重合体接合が好適である。

前処理された血液をフィルタ2の上に加えるこ  
とにより血液中の細菌はフィルタ2の上でろ過  
され、血液は吸水体1に吸収され過剰の血液は  
空間8に貯留する。ろ過により圧迫された空気  
は通気孔7から外気へ排出される。吸収された  
血液は吸水体1に含有されている増殖成分を吸  
着し、フィルタ上の細菌で養分を提供する。ろ  
過終了後、知る増殖菌を恒温に保つことによ  
り血液中の細菌をフィルタ上で培養してコロ  
ニーを育成することができる。

かくして培養された細菌は、コロニーの観察、  
菌落調定、菌の同定、薬剤感受性試験等に供さ  
れる。

次に実施例を示して本発明の方法をさらに詳  
しく説明する。

従来の懸液培養よりすぐれていた。

表 1

菌 名	吸 水 体 量	1 日 後			2 日 後		
		フ ィ ル タ 5 号	ベ キ ン タ イ ナ 50	保 乳 5 号	フ ィ ル タ 5 号	ベ キ ン タ イ ナ 50	保 乳 5 号
<i>Meningitis</i>	30	22	—	—	22	—	—
<i>Meningitis</i>	22	17	—	—	17	—	—
<i>Candida</i>	14	15	—	—	15	—	+
<i>albicans</i>	2	3	—	—	3	—	—
<i>Bacteroides</i>	15	14	—	+	14	+	+
<i>fragilis</i>	4	7	—	+	7	+	+
<i>Peptostreptococcus</i>	17	4	—	—	18	+	+
<i>parvulus</i>	6	4	—	—	1	+	+

表1 従来法との比較

— 陽性 — 陰性

## B. 発明の作用効果

以上詳述したように、本発明の方法は、増殖  
培養の菌培養をずんとなく、検体血液中の細  
菌全部を直接分離しコロニーの育成培養するた

め従来法に比較して操作が簡便であり血液中の  
すべての菌を培養するので菌種の数が存在する  
場合の各々の菌の検出率も高い。また検体中の  
菌数をコロニー数より測定することも可能であ  
る。

さらに本発明の方法ではフィルタ上で菌を増  
殖培養と同時にコロニー育成をするので従来の  
懸液培養培養に比較して培養時間がコロニー育  
成に必要な約1日と著しく短縮される。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の方法で使用されるろ過培養  
器の断面図である。

1—吸水体、2—フィルタ、3—容器、4—  
容器の蓋、7—通気孔

特許出願人 ナルセ薬式会社

代理人 井野士 西 行 公



第 1 図

